

氏名(本籍)	かとう やす たけ 加藤 恭 丈(三重県)
学位の種類	博 士(医 学)
学位記番号	博 甲 第 2929 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription (CBPと相互作用するNrf2の2つのドメインが、協調的に転写を活性化する)
主査	筑波大学教授 理学博士 坂内 四郎
副査	筑波大学教授 博士(医学) 榎 正幸
副査	筑波大学講師 医学博士 今川 重彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

親電子性化学物質は、生体高分子と容易に反応することにより、毒性を発揮する。これらの毒性を排除するために、一連の解毒化酵素および抗酸化タンパク質の遺伝子が、親電子性物質応答配列(EpREまたは抗酸化剤応答配列ARE)を介して転写誘導される。転写因子Nrf2(NF-E2 related factor 2)は、EpRE/AREを介した転写誘導を正に制御する。また、親電子性物質の刺激により、Nrf2のDNA結合活性の増強と、核内のNrf2タンパク質の蓄積が観察される。しかしながら、いったんDNAに結合したNrf2がいかにして転写を活性化するのは全く解っていない。本研究は、Nrf2の強い転写活性化能の分子基盤を解明するために、Nrf2の6箇所の間高度保存領域(Nrf2-ECH homology region; Neh), 特に、転写活性化ドメインであることが予想されたNeh4とNeh5に注目してNrf2による転写活性化機構の解析を行った。

(対象と方法)

Neh4やNeh5が転写活性化に果たす役割を探るために、これらの領域の欠失変異体をARE/EpRE制御領域を持つリポーター遺伝子とともにHepalclc7細胞に一過性共発現させ、その転写活性化能を調べた。またNrf2とCBP(CREB binding protein)との相互作用を示すために、Nrf2を過剰発現した293T細胞において、Nrf2抗体を用いた免疫沈降実験を行った。さらに、Nrf2とCBPとの相互作用部位を詳しく検討するために、酵母を用いたタンパク質間相互作用試験と、ウサギ網状赤血球抽出液による*in vitro*転写/翻訳系を用いた免疫沈降実験を行った。免疫沈降実験には、Nrf2抗体と酵母Gal4抗体を用いた。

(結果)

Neh4やNeh5を欠失するNrf2変異体の転写活性は野性型に比べそれぞれ1/5, 1/6に減弱していた。また、酵母Gal4DBDと欠失Nrf2との融合タンパク質(GBD-Nrf2)を作製し、Gal4結合領域を持つリポーター遺伝子との一過性共発現により転写活性化能を調べた。その結果、Neh4とNeh5を共に含む融合タンパク質の転写活性化能は80倍であったが、Neh4やNeh5単独の融合タンパク質ではそれぞれ10倍と30倍であった。このことは、Neh4やNeh5が、協調的に転写を活性化していることを示唆した。一方、CBPをベイトにした酵母two-hybridスクリーニ

ングからNrf2が単離された。そこで、Nrf2による転写活性化にCBPが関与しているかどうかを調べるために、CBPの特異的阻害因子であるEIAを共発現させると、Nrf2の転写活性化能は1/2にまで低下した。融合タンパク質であるGBD-Nrf2に対しても同じような抑制効果がみられた。また、293t細胞にNrf2を過剰発現させた全細胞抽出液において、Nrf2抗体を用いた免疫沈降実験を行ってみたところ、Nrf2と共沈する内在性CBPを検出した。このことは、CBPがNrf2のコアクチベーターとして働くことを示唆した。そこで、Nrf2とCBPとの相互作用を酵母タンパク質間相互作用検出系と免疫沈降実験を用いて更に詳しく調べたところ、Neh4とNeh5を共に含む領域は、Neh4、Neh5単独の場合よりも強くCBP C/H3領域と結合した。これらのことにより、Neh4とNeh5は、協調的にCBPと相互作用することがわかった。

(考察)

Nrf2のNeh5ドメインはp45やNrf1の転写活性化ドメインと相同性がある。興味深いことに、Neh5類似領域を含むp45N末端領域は、Nrf2 Neh5領域と同様に、CBPのC/H3領域とN末端領域の療法に相互作用することが報告されている。一方、Nrf2のNeh4ドメインは、そこに含まれるTRAM (Transcriptional adaptoe motif) 結合モチーフを介してCBPと結合すると考えられる。これら2つの領域によるCBPとの協調的な相互作用がNrf2の強い転写活性化能の分子基盤を形成するものと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

CBPは多くの転写因子のコアクチベーターとして、転写因子による転写促進に重要な役割を演じていることが知られている。本研究は強力な転写促進を引き起こす転写因子Nrf2においても、CBPが結合し、コアクチベーターとして作用することを、種々の分子生物学的手法を用いて、初めて示したものである。また、CBPとの結合に関与するNrf2側のドメイン構造を解析し、二つのドメインが協調的に相互作用し、Nrf2の転写活性化に寄与することを明らかにした。Nrf2の転写活性化が強力なため、これらの知見はCBPが関与する転写の活性化機構をさらに研究する上で寄与するところが大きいと思われる。実験は遺伝子を過剰発現させたり、何らかの遺伝子導入をした細胞を用いて行われているので、通常の細胞におけるNrf2とCBPとの結合の定量的解析などが今後の課題と思われる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。